

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20620091151293

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

小球藻培养条件优化及在含铬废水处理中的应用

**Optimization for Oil Production and Application in
Treatment of Waste Water Containing Chromium by
*Chlorella vulgaris***

文昌

指导教师姓名: 卢英华 教授

专业名称: 生物化工

论文提交日期: 2012 年 月

论文答辩日期: 2012 年 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

微生物油脂是产油微生物以甘油三酯的形式积累在细胞中的一类油脂。微生物油脂的组成以 C_{16} 和 C_{18} 系脂肪酸为主，可代替植物油作为食用油。同时，微生物油脂富含功能性多不饱和脂肪酸，是婴儿的视力及脑力发育必不可少的成分，由于其安全无毒，可代替鱼油添加到婴幼儿食品中。此外，微生物油脂品质优良，是生物柴油的绿色替代品。在油源紧缺的今天，发展微生物油脂具有重大的意义。

小球藻是一类优良的产油脂微生物。小球藻在生长时可生产最高达 86% 的脂类，而且其生长对外界环境要求低、生长迅速，可以为制备生物柴油提供大量的原料，这些优势使得近年来对小球藻生产生物柴油的研究成为重点项目。通过对小球藻培养的深入研究，可以有效地提高小球藻的生物量和产油能力。

本文首先搭建了一个性能优良的光生物反应器，从三株产油藻种中筛选出发藻种为小球藻 *Chlorella vulgaris*，并对此藻种培养条件进行了以下优化：最优的培养方式为自养-异养结合培养、最优的初始培养基为 SE 培养基、最优初始 pH 为 7.0、最优培养温度为 25 °C、最优光照强度为 4000 lux、最适葡萄糖添加量为 5 g/L、最适氮源为 $NaNO_3$ 、最适 $NaNO_3$ 添加量为 0.25 g/L。利用此优化培养基在优化培养条件下培养小球藻 *Chlorella vulgaris*，生物量达到 1.24 g/L 以及油脂产量达到 0.57 g/L，分别比初始培养条件下的生物量 0.8 g/L 以及油脂产量 0.175 g/L 提高了 0.55 和 2.25 倍。

其次，考察了碳源种类以及碳氮比对小球藻 *Chlorella vulgaris* 产油的影响：四种不同碳源下，小球藻 *Chlorella vulgaris* 产油情况不同，其中以葡萄糖和赤糖作混合碳源时小球藻的油脂产量最高，这表明自养-异养培养小球藻时，可以使用混合碳源来代替单一碳源，降低底物的成本。混合碳源能有效提高小球藻油脂中不饱和脂肪酸的含量，提高小球藻生产油脂的经济价值。不同碳氮比下小球藻 *Chlorella vulgaris* 的产油情况相差不大，以 C/N 为 57 时产油量最高。碳源浓度越高，越有利于长链脂肪酸的积累。小球藻 *Chlorella vulgaris* 所产油脂脂肪酸以 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 为主，这些都是制备生物柴油的主要原料。

最后,通过小球藻废藻体对废水中重金属 Cr(VI)生物吸附特性的探讨,确定处理时间 180 h,最佳废藻体添加量为 3 g/L,最佳处理温度为 25 °C,最佳处理 pH 为 1.5。Langmuir 模型能更好的用于模拟废藻体对 Cr(VI)生物吸附的过程,在上述最佳条件下,废藻体对 Cr(VI) 理论最大去除量、最大还原量以及对总铬的最大生物吸附量分别为 184.3、123.1 和 61.48 mg/g。小球藻 *Chlorella vulgaris* 废藻体处理含铬废水的作用机制可能为“还原-吸附耦合型”。

关键词: 小球藻 (*Chlorella vulgaris*) ; 自养-异养结合培养; 油脂; 培养优化; 生物吸附

Abstract

Microbial oil is accumulated by oleaginous microorganisms as the form of Triacylglycerol(TAG). With a fatty acid profile rich in C₁₆ and C₁₈, Microbial oil could take place of vegetable oil. It is non-toxic and now used extensively as dietary supplement in infant formula instead of fish oil for it is rich in polyunsaturated fatty acids, which is necessary for visual acuity and mental development. Microbial oil is also an alternative renewable source of conventional oil in biodiesel production because of its good quality. Due to the increasing press and demand of oil supply in recent years, microbial oil is becoming a developing area of high concern.

Chlorella sp. is a kind of suitable and good strain lipid production. In recent years, the production of fatty acid by *Chlorella* sp. has gained more and more attention due to its high lipid content (up to 86%), low demand on nutrient and the outside environment, and rapid growth rate that allow to provide a lot of raw materials for biodiesel production. Nowadays, It is still necessary to study the cultivation of *Chlorella* sp. to improve its oil production capacity.

In this study, the effect of medium components and cultivation conditions on the cell growth and oil production of *Chlorella* sp. was investigated. A high-lipid production strain of *Chlorella vulgaris* was screened from three different kinds of *Chlorella* strains, i.e., *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris* and *Chlorella protothecoids* using a home-made tubular photo-reactor. The optimized culture conditions were autotrophic-heterotrophic combined cultivation using SE medium as the initial medium with an initial pH of 7.0, cultivation temperature of 25 °C, and illumination intensity of 4000 lux. The best carbon and nitrogen source were glucose of 5 g/L and NaNO₃ of 0.25 g/L, respectively. The biomass reached 1.24 g/L with the lipid concentration of 0.57 g/L under optimized cultivation conditions, which were 0.55 and 2.25 times higher than those obtained under the initial cultivation conditions, respectively.

The effect of carbon source and carbon/nitrogen (C/N) ratio on the oil yield of *Chlorella vulgaris* was studied. When glucose and red sugar were used as mixed carbon sources, lipid yield was higher than those with glucose as the sole carbon source, indicating the mixed carbon sources have the potential to increase lipid production that can be used to replace glucose as the carbon source for the growth of *Chlorella vulgaris*. Mixed carbon sources were benefit for the accumulation of unsaturated fatty acid in lipid of *Chlorella vulgaris*, and this would improve the economic value of lipid production by *Chlorella vulgaris*. The component of lipids produced by *Chlorella vulgaris* under different C/N ratios was found to be similar, the lipid yield reached the highest with the C/N ratio of 57. High concentration of carbon sources was benefit for the accumulation of long-chain fatty acids. The main components of lipid produced by *Chlorella vulgaris* were C16:0 and C18:0, these were all materials for biodiesel preparation.

Through investigating of Cr(VI) biosorption characteristics treated with waste *Chlorella vulgaris* biomass for 180 h, the best biosorption conditions were waste algae biomass of 3 g/L, treatment temperature of 25 °C, treatment pH of 1.5. Langmuir model was more suitable for simulating Cr(VI) biosorption treated with waste *Chlorella vulgaris* biomass, with these best biosorption conditions, the theoretical maximum treatment capacity, bioreduction capacity of chromium(VI) and biosorption capacity of total chromium was 184.3, 123.1, 61.5 mg/g, respectively. Through our research, speculated that “adsorption-coupled reduction” was probably the mechanism in Cr(VI) biosorption treated with fat-free *Chlorella vulgaris* biomass.

Key words: *Chlorella vulgaris*; Autotrophic-heterotrophic combined cultivation; Microalgal oil; Optimization of cultivation conditions; biosorption

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第一章 文献综述.....	1
1.1 生物柴油概述.....	1
1.1.1 生物柴油的性质.....	1
1.1.2 生物柴油的研究进展.....	2
1.1.3 生物柴油的国内外应用现状.....	4
1.1.4 限制生物柴油发展的关键因素.....	6
1.2 微藻概述.....	6
1.2.1 产油微藻.....	8
1.2.2 小球藻简介.....	9
1.2.3 能源微藻的开发利用.....	11
1.2.4 国内外研究进展.....	13
1.3 小球藻油脂合成影响因素.....	14
1.3.1 培养基组成.....	14
1.3.2 温度.....	14
1.3.3 光照.....	15
1.3.4 pH 值.....	15
1.3.5 培养方式.....	16
1.3.6 碳氮源.....	16
1.4 小球藻在重金属生物吸附的应用.....	17
1.4.1 重金属废水.....	17
1.4.2 重金属生物吸附.....	18
1.4.3 藻类对重金属的生物吸附.....	20
1.5 本课题的研究目的及内容.....	22
第二章 材料与方法.....	24
2.1 材料与试剂.....	24

2.1.1 藻种.....	24
2.1.2 实验试剂.....	24
2.1.3 培养基及培养条件.....	24
2.1.4 实验设备.....	27
2.2 实验方法.....	27
2.2.1 生物量的测定.....	27
2.2.2 葡萄糖含量的测定.....	29
2.2.3 硝酸盐氮含量的测定.....	30
2.2.4 粗油脂的提取.....	32
2.2.5 粗油脂的甲酯化.....	32
2.2.6 油脂含量的测定.....	32
2.2.7 油脂成分的气相分析.....	35
2.2.8 总铬及六价铬的测定.....	37
第三章 小球藻 <i>Chlorella vulgaris</i> 培养条件的优化及油脂成分的分析	41
3.1 光反应器的设计和藻种的选择.....	41
3.1.1 光反应器设计.....	41
3.1.2 藻种筛选.....	42
3.2 小球藻基础培养条件的优化.....	42
3.2.1 培养基类型.....	42
3.2.2 培养方式.....	43
3.2.3 初始 pH.....	45
3.2.4 培养温度.....	47
3.2.5 光照强度.....	47
3.2.6 氮源种类.....	48
3.2.7 氮源浓度.....	50
3.2.8 葡萄糖浓度.....	51
3.3 碳源种类及碳氮比对小球藻油脂成分的影响.....	53
3.3.1 碳源种类.....	53

3.3.2 碳氮比.....	56
3.4 本章小结.....	59
第四章 去脂小球藻 <i>Chlorella vulgaris</i> 对重金属 Cr(VI)生物吸附及生物还原的研究.....	61
4.1 废藻体预处理.....	61
4.2 去脂小球藻 <i>Chlorella vulgaris</i> 处理重金属 Cr(VI)的条件优化.....	62
4.2.1 废藻体量.....	62
4.2.2 温度.....	65
4.2.3 pH.....	68
4.2.4 Cr(VI)浓度.....	71
4.2.5 去脂小球藻 <i>Chlorella vulgaris</i> 对重金属 Cr(VI)生物吸附及生物还原的机理探讨.....	73
4.3 本章小结.....	75
第五章 结论与展望.....	76
5.1 结论.....	76
5.2 存在的问题与展望.....	77
参考文献.....	78
附录.....	85
硕士在读期间发表论文.....	88
致谢.....	89

CONTENTS

Chinese abstract.....	I
English abstract.....	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Introduction of biodiesel.....	1
1.1.1 The properties of biodiesel.....	1
1.1.2 Research development of biodiesel.....	2
1.1.3 Application status in domestic and overseas of biodiesel.....	4
1.1.4 Key factors to restrict the development of biodiesel.....	6
1.2 Introduction of microalgae.....	6
1.2.1 Oil microalgae.....	8
1.2.2 Introduction of <i>Chlorella</i>	9
1.2.3 Development and utilization of energy microalgae.....	11
1.2.4 Research and development in domestic and overseas.....	13
1.3 The influencing factors to lipid synthesis of <i>Chlorella</i>.....	14
1.3.1 The components of medium.....	14
1.3.2 The temperature.....	14
1.3.3 The illumination.....	15
1.3.4 The pH value.....	15
1.3.5 The cultivation type.....	16
1.3.6 The carbon and nitrogen sources.....	16
1.4 Application in heavy metals biosorption by <i>Chlorella</i>.....	17
1.4.1 Wastewater containing heavy metals.....	17
1.4.2 Biosorption of heavy metals.....	18
1.4.3 Biosorption of algae to heavy metals.....	20
1.5 Purpose and contents of this study.....	22
Chapter 2 Materials and methods.....	24
2.1 Materials and reagents.....	24

2.1.1 Algae.....	24
2.1.2 Experimental reagents.....	24
2.1.3 Medium and cultivation conditions.....	24
2.1.4 Experimental instruments.....	27
2.2 Experimental methods.....	27
2.2.1 Measurement of biomass.....	27
2.2.2 Measurement of glucose concentration.....	29
2.2.3 Measurement of nitrate nitrogen content.....	30
2.2.4 Extraction of crude oil.....	32
2.2.5 Methyl-esterification of crude oil.....	32
2.2.6 Measurement of total lipid content.....	32
2.2.7 Determination of lipid components by gas chromatography.....	35
2.2.8 Measurement of total chromium and Cr(VI).....	37
Chapter 3 Optimization of cultivation conditions of <i>Chlorella vulgaris</i>	
and analysis of lipid component.....	41
3.1 Construction of photo-reactor and screening of algae.....	41
3.1.1 The construction of photo-reactor.....	41
3.1.2 The screening of algae.....	42
3.2 Optimization of cultivation conditions of <i>Chlorella vulgaris</i>.....	42
3.2.1 Medium type.....	42
3.2.2 Cultivation mode.....	43
3.2.3 Initial pH.....	45
3.2.4 Cultivation temperature.....	47
3.2.5 Illumination intensity.....	47
3.2.6 Nitrogen source.....	48
3.2.7 Nitrogen concentration.....	50
3.2.8 Glucose concentration.....	51
3.3 Effect of carbon sources and C/N on lipid component of <i>Chlorella</i>	
<i>vulgaris</i>.....	53

3.3.1 Carbon sources.....	53
3.3.2 C/N.....	56
3.4 Conclusions.....	59
Chapter 4 Research of biosorption and bio-reduction by chromium	
treated with fat-free <i>Chlorella vulgaris</i>.....	61
4.1 Treatmen of waste algae biomass.....	61
4.2 Optimization of Cr(VI) biosorption treated with fat-free <i>Chlorella</i>	
<i>vulgaris</i>.....	62
4.2.1 Amount of waste algae biomass.....	62
4.2.2 Temperature.....	65
4.2.3 pH value.....	68
4.2.4 Concentration of Cr(VI).....	71
4.2.5 Mechanism of Cr(VI) adsorption by fat-free <i>Chlorella vulgaris</i>	73
4.3 Conclusions.....	75
Chapter 5 Conclusions and prospects.....	76
5.1 Conclusions.....	76
5.2 Problems and prospects.....	77
References.....	78
Appendix.....	85
Publications.....	88
Acknowledgement.....	89

第一章 文献综述

1.1 生物柴油概述

生物柴油 (Biodiesel)，是指以油料作物、野生油料作物和工程微藻等水生植物油脂，以及动物油脂、废餐饮油等为原料油通过酯交换 (Transesterification reaction) 工艺制成的甲酯或乙酯燃料^[1]。生物柴油的主要成分是脂肪酸甲酯 (FAME)，是以可再生资源 (如油菜籽油、大豆油、玉米油、棉籽油、花生油、葵花子油、棕榈油、椰子油、回收烹饪油、动物油以及微生物油脂等) 为原料而制成，具备与石化柴油相近的性能。生产和使用生物柴油的技术已经存在了 50 余年^[2~4]。

1.1.1 生物柴油的性质

生物柴油具有一系列优越性，使之成为当今各国的研究热点，作为一个具有开发前景的能源也吸引了不少企业的目光。与石油柴油等传统能源相比，生物柴油的性能更加优良。主要表现在^[5]：

优良的环保特性。检测表明，与石化柴油相比，使用生物柴油可降低 90% 的空气毒性。由于生物柴油含氧量高，燃烧时排烟少，一氧化碳的排放量可减少约 10% (有催化剂时为 95%)。同时，生物柴油的生物降解性高。另外，生物柴油原料来源于光合作用，它可抵消由于生物柴油燃烧过程所释放的 CO_2 ，因此生产和使用生物柴油不会导致温室效应。

良好的燃料性能。生物柴油含氧量高于石油柴油，可达 11%，在燃烧过程中所需的氧气量较石化柴油少，燃烧、点火性能优于石化柴油，且燃烧残留物呈微酸性，可延长催化剂和发动机机油的使用寿命。

可再生性。与石油资源不同，生物柴油作为一种可再生能源，通过农业和生物科技的发展，其资源不会枯竭。且通用性好，无需改动柴油机，可直接添加使用，同时无需另添设加油设备、储运设备及人员的特殊技术训练^[6]。

1.1.2 生物柴油的研究进展

在近代社会的发展历史中,正是由于能源的发展,才极大地推动了社会的进步。石油作为一种天然化石燃料资源出现,在被人们正确认识和加以利用后,对社会的高速发展产生了不可估量的作用。然而,近几年,随着社会的高速发展,对石油、矿产等各种不可再生资源的需求也越来越高。尤其是在能源领域,石油作为社会发展的最主要能源之一,却是不可再生能源。随着科技的发展,地球上的石油资源大多已被勘探并开采,石油储量越来越少。另外,石油作为一种化石能源,在其燃烧过程中,会产生大量含硫、含氮化合物,对大气造成污染。而且,由于石油的大量燃烧,不可避免的产生了大量的二氧化碳气体,对大气的成分造成影响,造成所谓的“温室效应”。由此而引发的各种环境问题,已经对人类的生存和发展产生了严重的威胁。因此,寻求一种绿色的可持续发展的新能源引起世界各国科学家普遍关注,成为研究的热点^[7,8]。

生物柴油是以生物体油脂为原料,通过分解、酯化而得到的长链脂肪酸甲酯,是一种可以替代普通柴油使用的环保、可再生能源。油脂原料是制备生物柴油的关键,在不同的地域条件和环境下,制备生物柴油的油脂原料也不同。具体的有植物油脂、动物油脂、微藻脂肪酸以及地沟油等^[9]。植物油脂一般来自各种含油丰富的作物,用其制备柴油在技术和成本上都有优势。但是,这类油料作物,一方面其本身作为一种粮食作物,是关系国民生计的必需品,其生产首先要满足对国民生活的需要;另一方面,作为一种工业原料,其生产必定需要占用大量的耕地,在我国土地资源十分紧张条件下,无疑是不现实的。而动物油脂在这方面的缺点比植物油脂更明显。而作为废弃物回收的地沟油,虽然用其作为生物柴油原料不仅回收了资源,还减少了污染。但是,作为一种工业化生产的原料,地沟油不能保证稳定持续的供应,且回收后的成分十分复杂,导致在后续的工业化生产反应中,反应条件不稳定,不利于大规模的工业化生产。然而,微藻的生产不占用耕地,作为一种微生物,其生长速度迅速,对环境条件要求低。但是并不是所有的微藻都能制备生物柴油,同时油脂的提取和酯化的工艺目前成本很高。因此,在使用微藻制备生物柴油的研究中,找到合适的藻种,是解决问题的关键所在。

在国外,用于规模生产生物柴油的原料有大豆(美国)、油菜籽(欧盟国家)、棕榈油(东南亚国家)。日本、爱尔兰等国以植物油下脚料及食用回收油为原料生产生物柴油,成本较石化柴油低。美国、英国等西方国家正尝试使用一种高油脂的工程微藻来生产生物柴油。食用回收油价格低廉,取材广泛,亦是许多国家研究和利用的对象。中国目前主要以废餐饮油脂、动物脂肪和木本油籽为生物柴油的生产原料。

1) 废餐饮油脂生产生物柴油

废餐饮油脂俗称垃圾油、地沟油、涌水油、下脚油等,以动植物油脂为主,据不完全统计,我国每年产生的废餐饮油脂达 500 wt 以上,其中少部分被回收加工成脂肪酸等工业原料,大部分被直接排入下水道或重新流入餐饮市场,严重危害环境和消费者的健康^[10]。将餐饮废油转化成生物柴油,不仅市容环境问题得到解决,而且是一条变废为宝、节约能源、减少污染的有效途径。

2) 动物脂肪和木本油籽生产生物柴油

生产生物柴油,动物脂肪和木本油籽作原料相比餐饮废油,酸值低,杂质少,含水量小,因此预处理工序负担较轻。目前,国内用动物脂肪和木本油籽生产生物柴油的方法有微乳液法、酯交换法、酶合成法等。

3) 工程微藻生产

“工程微藻”生产柴油,是从海藻中提炼生物燃料,为柴油生产开辟了一条新的技术途径。利用“工程微藻”生产柴油,其优越性在于:微藻生产能力高,用海水作为天然培养基可节约农业资源;比陆生植物单产油脂高出几十倍;生产的生物柴油不含硫,燃烧时不排放有毒有害气体,排入环境中也可被微生物降解,不污染环境^[11-13]。

清华大学微藻生物能源实验室发明了微藻异养发酵生产生物柴油的新技术,通过对特别藻株特殊品系的筛选和代谢途径的改变,外加工业界成熟的发酵技术,细胞的发酵密度超过了 100 g/L,获取了大量异养干燥粉后提取油脂,经转酯化反应生成了高质量的生物柴油。缪晓玲和吴庆余^[14]利用正己烷从异养生长的小球藻细胞中提取了大量的油脂,在 30 °C,醇油摩尔比为 56:1,以及浓硫酸催化条件下,酯交换反应 4 h 后,可形成高质量的生物柴油。蔡志武^[15]利用二氧化

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库